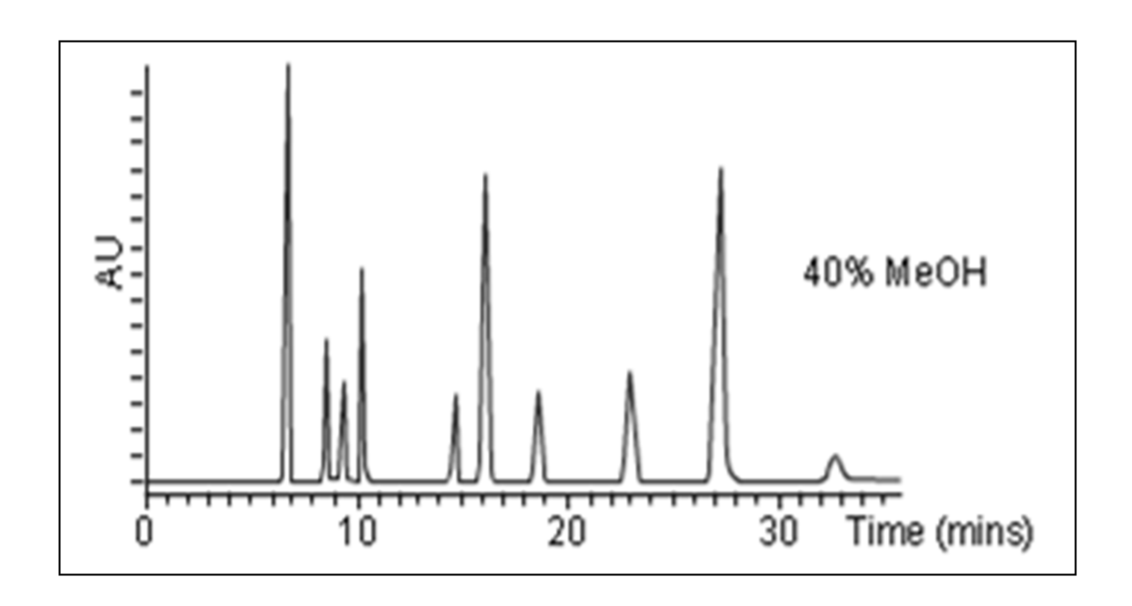
Les méthodes séparatives:
la chromatographie



I - Introduction

II - Aspects généraux de la chromatographie

III - La chromatographie liquide haute performance

IV -La chromatographie en phase gazeuse

V – La chromatographie d’exclusion stérique

Département Chimie

I- Introduction

Historique et définitions :

1906 : débuts de la chromatographie
1952 : prix Nobel de chimie aux biochimistes A. J. P Martin et R. L. M. Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne.

Chromatographie = procédé physico-chimique de séparation d'un mélange homogène liquide ou gazeux
Chromatographie moderne = méthode séparative rapide et performante couplée à des détecteurs sensibles et variés.

- chromatographie préparative
- chromatographie analytique:

Phase stationnaire = phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane.
Phase mobile = phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.
Elution = processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

Classification

a - Selon la technologie mise en œuvre

–Chromatographie **sur colonne**
–Chromatographie **de surface** :sur papier ou sur couche mince (CCM)

b -Selon la nature des phases

–Selon la nature de la phase mobile on distingue:

la chromatographie en phase liquide **CPL**
la chromatographie en phase gazeuse **CPG**
la chromatographie en phase supercritique **CPS**

–Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

la chromatographie gaz / solide **CGS**
la chromatographie gaz / liquide **CGL**
la chromatographie liquide / solide **CLS**
la chromatographie liquide / liquide **CLL**

c - Selon la nature des phases phénomènes mis en jeu dans la séparation

La chromatographie d'adsorption basée sur les processus répétés d'adsorption/désorption par la phase stationnaire (solide)
La chromatographie de partage basée sur les différences de solubilité des molécules entre la phase stationnaire (liquide) et la phase mobile
La chromatographie d'échange d'ions Échange entre une phase stationnaire ionisée et un soluté ionisé ou ionisable
La chromatographie d'exclusion basée sur la séparation des molécules en fonction de leur taille
La chromatographie d'affinité Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple

Interactions

Le partage des analytes est donc guidé par leurs interactions avec chacune des deux phases.
Plus l'analyte interagit avec la phase stationnaire, plus son élution sera longue.

Valeurs d'électronégativité de quelques éléments :

H	C	N	O	S	Cl

2,20	2,55	3,04	3,44	2,58	3,16

Ordre de polarité croissante des molécules :
R-H, R-X, R-NO_2, R-OR, R-COOR, RCHO, R-CONHR, ROH, H_2O, ArOH, RCOOH

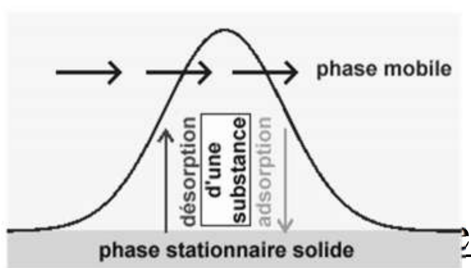
II- Aspects généraux de la chromatographie sur

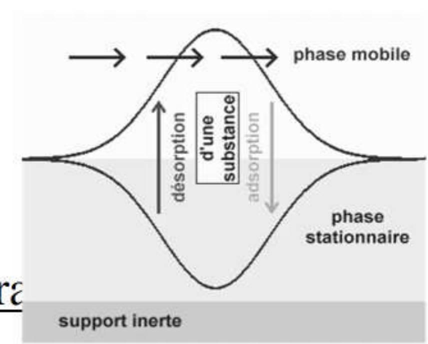
Forces de dispersions dipôle induit/dipôle induit		
Interactions dipôle/dipôle dipôle induit/dipôle permanent dipôle permanent/dipôle permanent		
Liaisons hydrogène		
Interactions diélectriques		

colonne

1- Le processus chromatographique

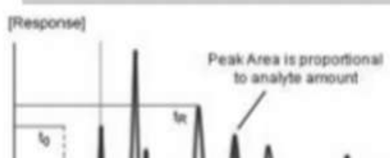
La phase mobile est continuellement introduite sur la colonne
L'échantillon est introduit sans arrêter le flux de phase mobile
Les solutés se répartissent entre les deux phases. Les composés sont élués en fonction de leur affinité vis-à-vis des phases
Les solutés sont détectés en sortie de colonne par le détecteur





e et les pics chromatogra

Le résultat de l'analyse est le chromatogramme (ensemble de pics)



Le pic chromatographique représente la distribution statistique des temps de transit du composé dans la colonne :
c'est une courbe de Gauss *(en chromatographie idéale)*

–Moyenne : temps de rétention

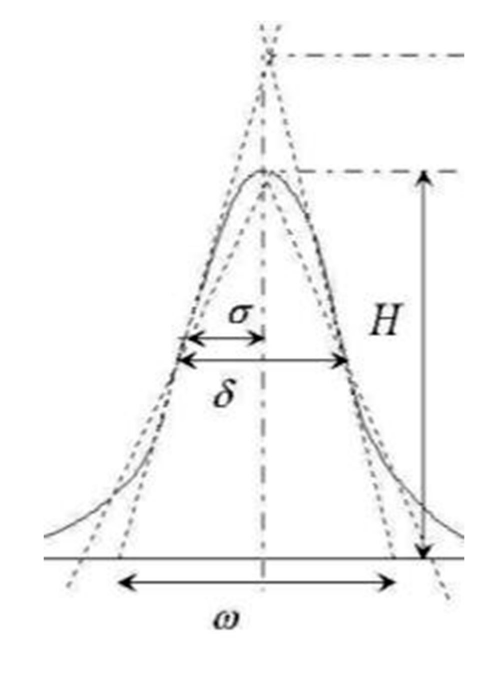
–Variance σ^2 : liée à l 'étalement de l 'arrivée des molécules

Le temps de rétention est une grandeur qualitative, il est identique pour des conditions identiques
L'aire ou la hauteur est une grandeur quantitative

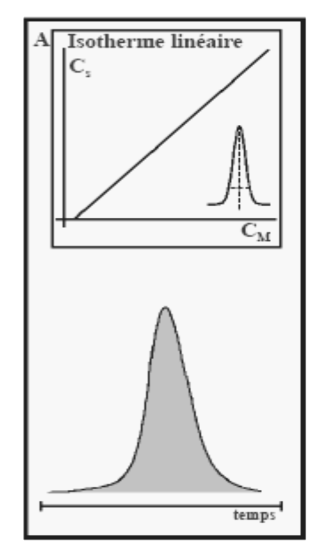
<u>W : largeur du pic à une ordonnée déterminée</u>

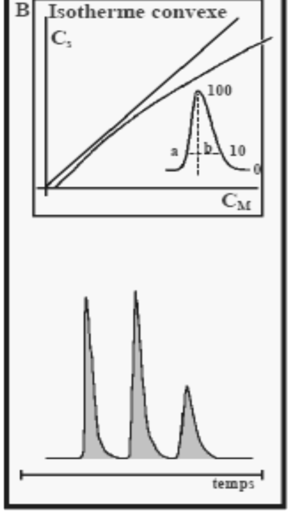
<u>A la base</u>

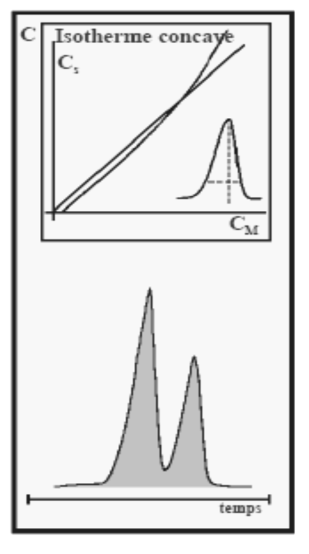
<u>A la mi-hauteur</u>



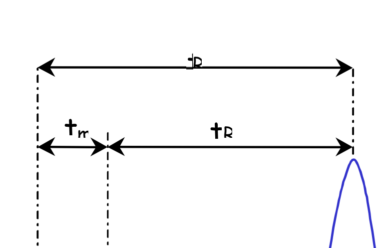
<u>Isothermes de distribution</u>
A: situation idéale à pic gaussien
B : situation dans laquelle la phase stationnaire est saturée
C : situation inverse dans laquelle le constituant est trop retenu dans la phase stationnaire







3- Les grandeurs de rétention



Le temps de rétention t_R:
= temps écoulé entre l'instant de l'injection
et celui déterminé au maximum du pic

Le temps mort t_m (ou t_0) :
= temps de rétention d'un composé non retenu par la colonne

t_m =

Le temps de rétention réduit t_R':
= différence entre temps de rétention et temps mort

t_R' =

Le temps de rétention dépend
-du couple soluté-phase stationnaire en CPG
-du triplet soluté-phase stationnaire-phase mobile en CL
-du débit de la phase mobile
-de la masse de phase stationnaire dans la colonne
-de la température de la colonne
-de la longueur de la colonne

Le temps de rétention ne dépend pas
-de la quantité de soluté injecté
-de la nature et de l'abondance des autres constituants
-de la nature de la phase mobile en CPG

Le volume de rétention V_R :
= volume de phase mobile nécessaire à l'élution du composé : $\mathbf{V_R = t_R \times D}$

Le volume mort V_m :
= volume de phase mobile nécessaire à l'élution d'un composé non retenu par la colonne
= volume de phase mobile dans la colonne = V_M
= volume interstitiel accessible: $\mathbf{V_m = V_0 = t_m \times D = t_0 \times D}$

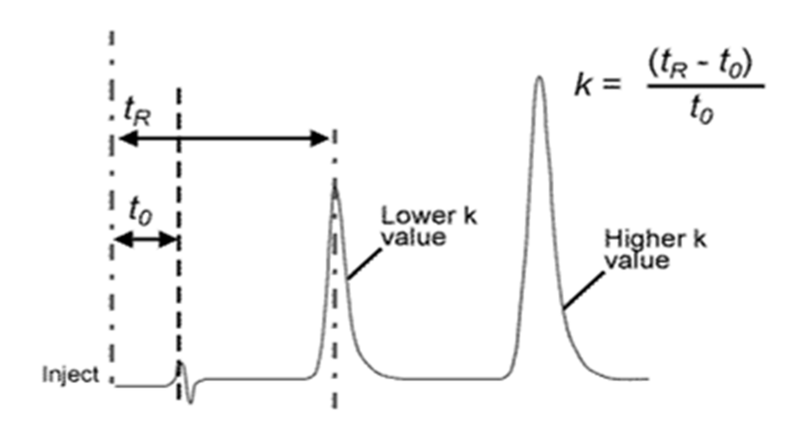
Le volume de rétention réduit :
= différence entre volume de rétention et volume mort **V_R' =**

On démontre que : $\mathbf{V_R = V_m + K\, V_S}$ avec V_S = volume de phase stationnaire

4- Les grandeurs de rétention relatives

Facteur de rétention ou facteur de capacité k :
Il décrit la vitesse de progression d'un soluté dans la colonne

–une valeur de k élevée indique que le composé est fortement retenu par la colonne et qu'il passe un temps significatif à interagir avec la phase stationnaire
–Les chromatographistes essaient d'avoir des valeurs de k comprises entre **1 et 10**



k est indépendant

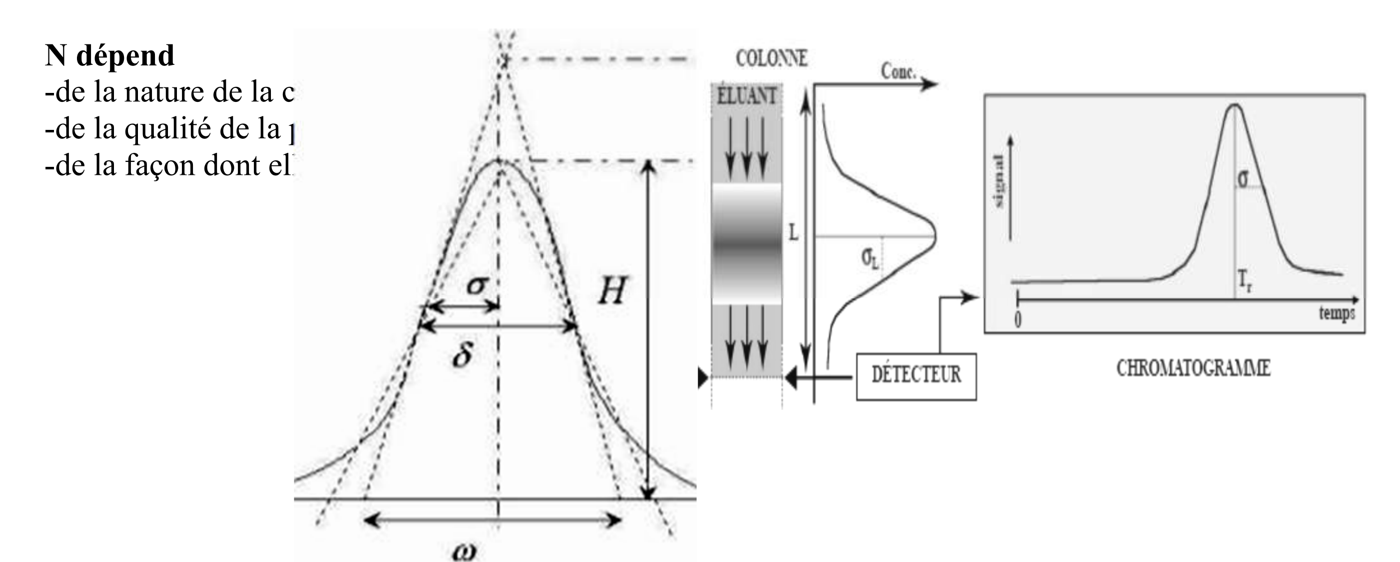
De faibles variations de débit
Des dimensions de la colonne

Exercice d'application : Exprimer le temps d'analyse , assimilable au temps de rétention du composé le plus retenu en fonction de la longueur de colonne L , de la vitesse de la phase mobile u et des volumes de phase mobile V_M et de phase stationnaire V_S dans la colonne

5- L'efficacité : Nombre d'étages théoriques N

Le nombre d'étages théoriques mesure la dispersion de l'analyse lors de sa traversée de la colonne

N dépend
-de la nature de la c
-de la qualité de la
-de la façon dont el



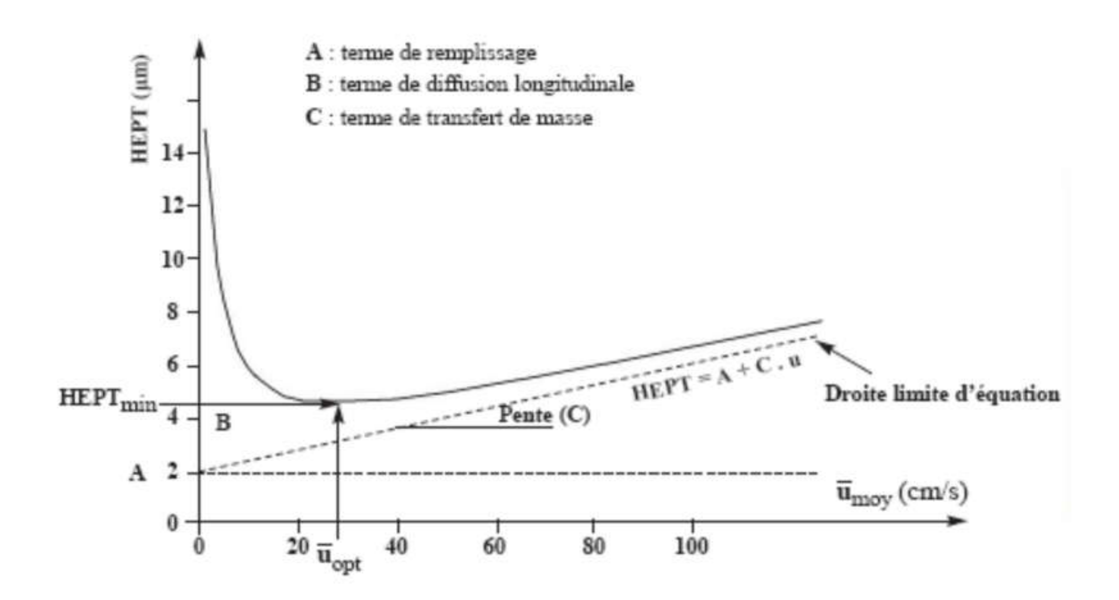
Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

La théorie des plateaux néglige le passage continue de la phase mobile sur la phase stationnaire
Ce passage produit un élargissement ou un rétrécissement des pics
Giddings lie la HEPT à des paramètres qui dépendent de la vitesse de la phase mobile

Equation de Van Deemter

A = diffusion turbulente
B = diffusion longitudinale
C = transfert de masse
u = vitesse de la phase mobile, dépend de :

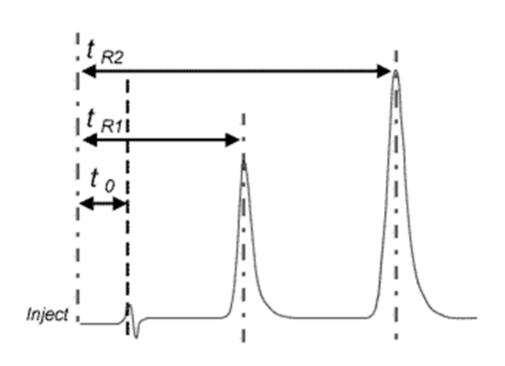
- La température
- La pression
- La colonne



6- Le facteur de sélectivité : α

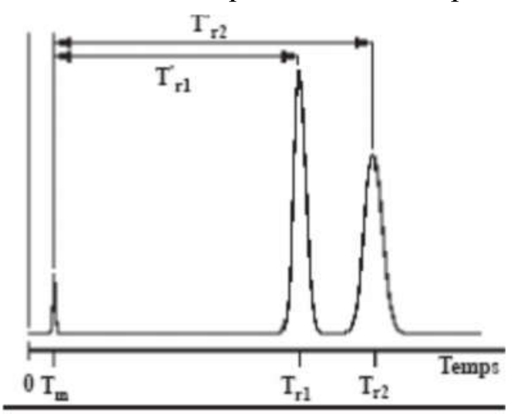
Décrit la position de 2 pics adjacents situés sur un chromatogramme. Il est toujours supérieur à 1.
α représente la capacité qu'à une colonne à séparer chimiquement deux composés

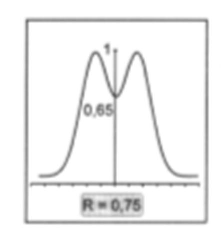
Équilibre $C_M \Leftrightarrow C_S$

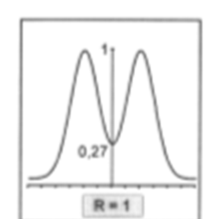


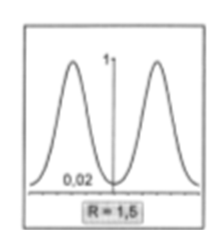
7- Le facteur de résolution Rs

Donne la mesure quantitative de l'aptitude d'une colonne à séparer deux solutés





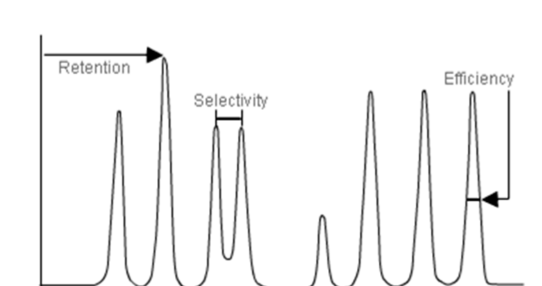




Exercice d'application :Exprimer Rs en fonction des largeurs des pics à mi-hauteur

8- Relation fondamentale

Relation de PURNELL



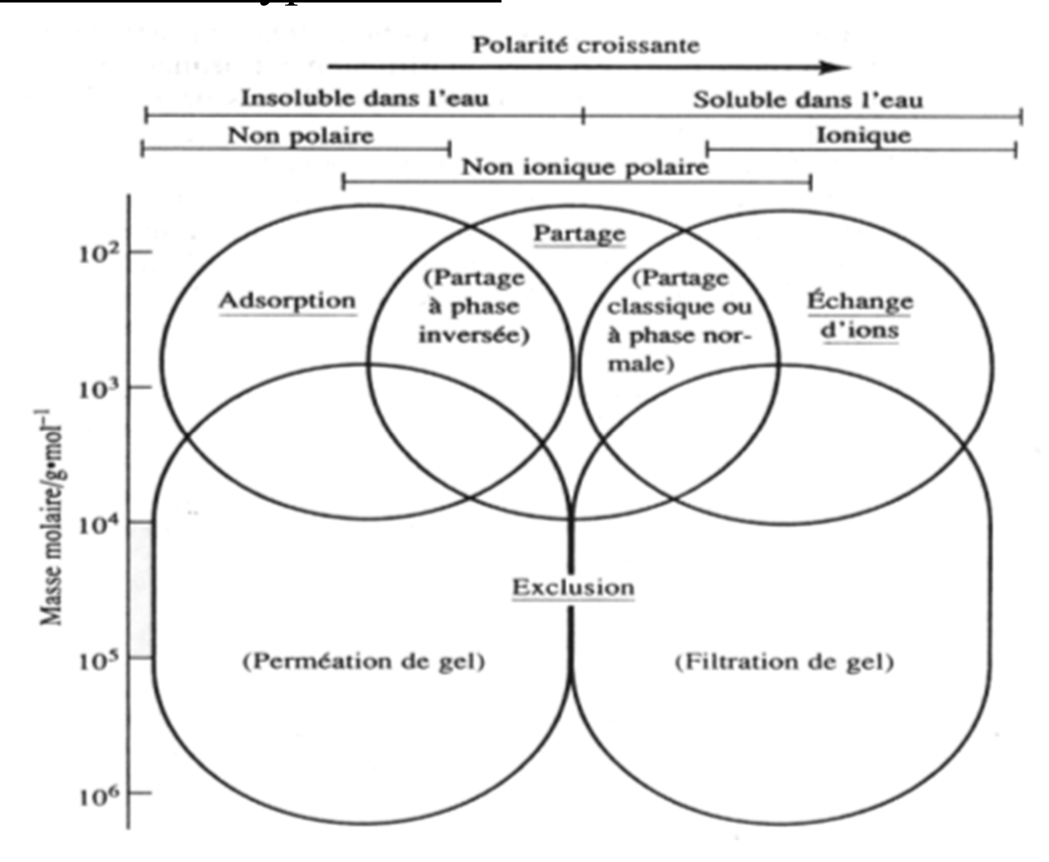
Relation d'approximation

<u>Exercice d'application</u> :
Montrer que l'expression de Purnell est équivalente à celle de la définition chromatographique de Rs lorsque les 2 pics ont des largeurs égales

<u>Rq</u> : on montre que la relation d'approximation est équivalente à celle de la définition chromatographique de Rs lorsque les 2 pics ont des efficacités égales

III- La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

1- Les différents types de CL



2- L'appareillage

2-1- Le chromatographe

Chaque paramètre chromatographique doit être optimisé pour assurer l'analyse qualitative et quantitative

- –La phase mobile
- –La phase stationnaire
- –Dimension de la colonne
- –Le volume d'injection
- –Le traitement de l'échantillon
- –Le débit de la phase mobile
- –La température de la colonne
- –Le détecteur

2-2- Les solvants

2-3- Les dégazeurs

2-4- Les pompes

Généralement pompes à pistons alternatifs

- Petit volume interne
- Pression de sortie élevée (700 bars)
- Débit constant quelque-soit la pression dans la colonne

Pompe isocratique

- 1 seul solvant délivré
- Travail en mode isocratique

Pompe binaire: 2 pompes

- Travail en mode gradient
- Mélange des solvants à haute pression
- Gradient le plus reproductible (débit et composition extrême)

Pompe quaternaire : une seule tête de pompe

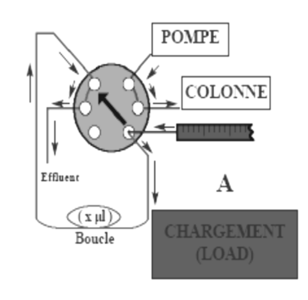
- Maximum 4 solvants délivrés
- Travail en mode gradient

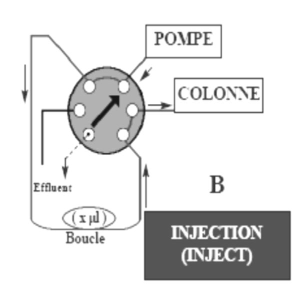
2-5- L'injecteur

Vanne à haute pression à 6 voies

–Injection brève pour ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne

–Grande reproductibilité





2-6- La colonne

- Généralement courtes et en acier inoxydable (Longueur de 10 à 25 cm)
- Elles sont remplies de phase stationnaire
  - –Billes de 5 à 10 µm de diamètre
  - –Phase liquide déposée sur les billes (silice)
- Nombre de plateaux théoriques varie de 1000 à 50000
- Souvent précédée d'une colonne de garde

Colonne Diamètre d_C

Volume $V_C = V_M + V_S$

Phase mobile (Eluant) Viscosité η

Vitesse d'écoulement u

Volume $V_M = V_i + V_p$

(V_i Intergranulaire ; V_p Porosité (stagnation))

Phase stationnaire : Particules de taille moyenne d_p

Volume V_S

Loi de Darcy

2-7- Les détecteurs

2-7-1- Termes généraux et concept

•**Sélectivité** :
- un détecteur non sélectif réagit avec la solution qui passe dans la cellule quand un composé est élué…
–un détecteur sélectif ne réagit pas avec la solution mais mesure une réponse due à une propriété de la molécule de soluté (i.e. UV absorbance)

•**Sensibilité**
–plus petit signal détectable:

•**Limite de détection et de quantification**
–Limite de détection= la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée (3 fois le bruit de fond)
–Limite de quantification = la plus petite concentration d'analyte, dans une certaine matrice, qui peut être mesurée (10 fois le bruit de fond)

•**Domaine de linéarité**

Détercteur :	**Linéarité**	**Sélectivité**	**Sensibilité**
UV	5	Moyenne	
Indice de réfraction	4	Faible	
Fluorescence	2	Grande	
Conductivité		Faible	
Electrochimique	2	Grande	
Spectromètre de masse	3-4	Grande	

2-7-2- Détecteur UV-Visible

•**Détecteur le plus utilisé en HPLC**
remplit un nombre important de critères du détecteur idéal : sensibilité, linéarité, sélectif et utilisable en gradient d'élution, non affecté par des fluctuations de température
•**Mesure de l'absorbance : loi de Beer-Lambert**

2-7-3- Le détecteur à barrettes de diodes

•Détection à une seule λ ou à plusieurs λ
•Acquisition dynamique du spectre
•Obtention du spectre de chaque composé
•Détection simultanée à 2 λ (pureté)
•Soustraction de λ (compensation de dérive de ligne de base)
•Déconvolution des spectres (cas de co-élution)

2-7-4- Détecteur fluorimétrique

Fluorescence
–Energie absorbée distribuée en niveaux de rotation et vibration
–Retour à l'état fondamental sans émission de lumière : relaxation
–Puis émission d'énergie (détectée puis amplifiée)

L'émission a lieu à une λ plus grande que celle de l'absorption

3- La chromatographie d'adsorption

Phase stationnaire solide : silice ou alumine
Phase mobile
–Caractérisée par la **force éluante** ε^0 : énergie d'adsorption du solvant par unité de surface
–ε^0 pour l'alumine ($\varepsilon^0_{silice} = 80\% \ \varepsilon^0_{alumine}$)

Solvant	fluoroalcanes	cyclohexane	hexane	CCl_4	1-chlorobutane	Ether isopropylique
ε°	- 0,25	- 0,2	0,01	0,18	0,26	0,28

Solvant	toluène	Ether ethylique	chloroforme	dioxane	THF	Acetate d’éthyle
ε°	0,29	0,38	0,40	0,56	0,57	0,58
Solvant	nitrométhane	acétonitrile	méthanol	éthanol	Ethylène glycol	eau
ε°	0,65	0,65	0,85	0,88	1,11	Très élevée

Ordre d’élution des composés

4- Chromatographie de partage

Chromatographie liquide/liquide (applications marginales)
Phase stationnaire retenue par adsorption sur le support
Chromatographie liquide/phase greffée (majorité des applications)
Phase stationnaire liée chimiquement au support

Support : à base de silice :Particules uniformes, poreuses et mécaniquement stables, de diamètre de 3, 5 ou 10 µm, surface entièrement hydrolysée

Les phases stationnaires : Obtenues par réaction de silanisation

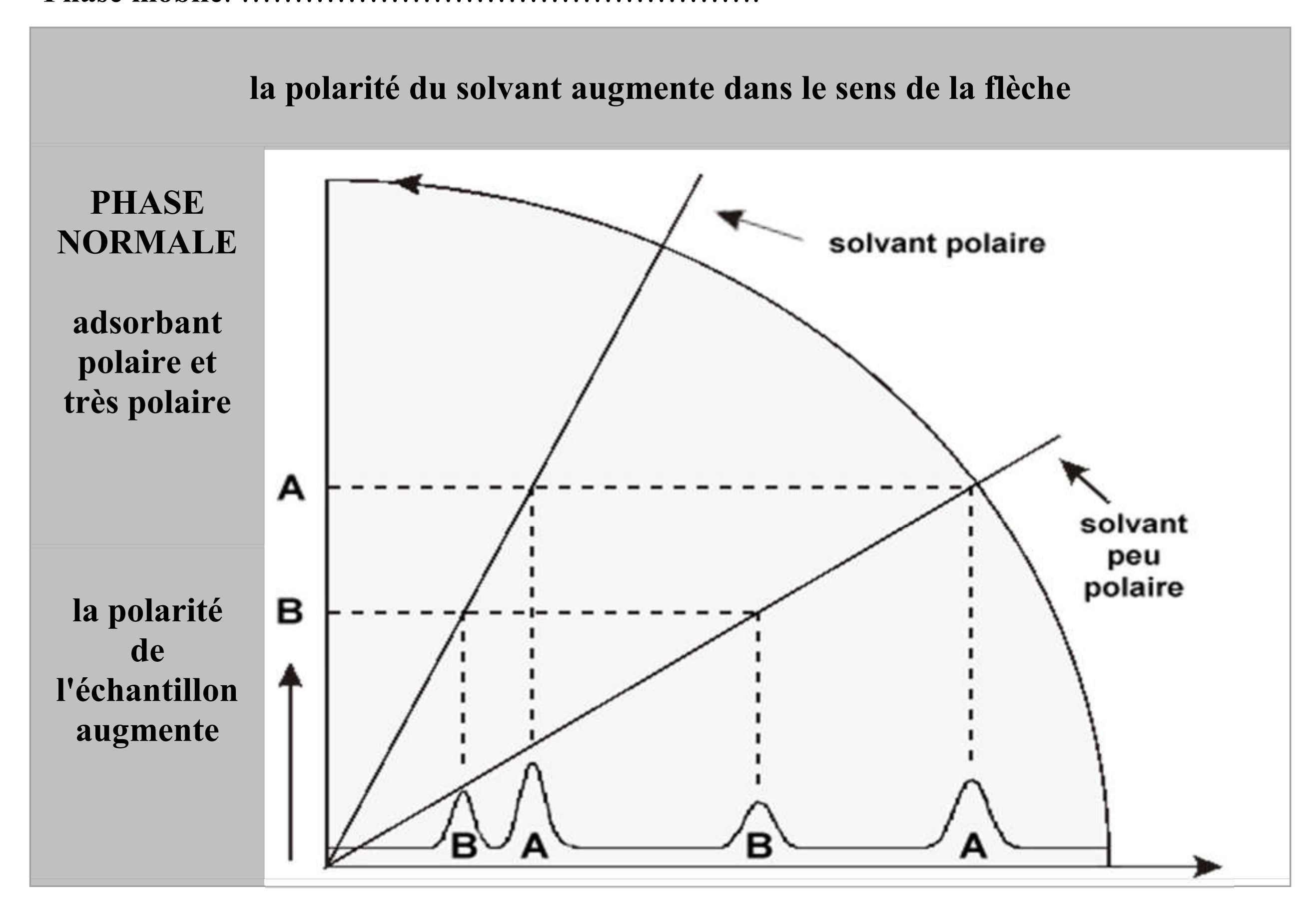
Exemples : C18 ; C8 , phenyl ; amino ….

Les phases mobiles Classées selon leur polarité: indice de polarité de …………… (P’) basée sur des mesures de solubilité de la substance étudiée dans 3 solvants

Solvant	fluoroalcanes	cyclohexane	hexane	CCl_4	1-chlorobutane	Ether isopropylique
P’	<- 2	04	0,1	1	1,6	2,4
Solvant	toluène	Ether ethylique	THF	chloroforme	éthanol	Acetate d’éthyle
P’	2,4	2,8	4	4,1	4,3	4,4
Solvant	dioxane	méthanol	acétonitrile	nitrométhane	Ethylène glycol	eau
P’	4,8	5,1	5,8	6	6,9	10,2

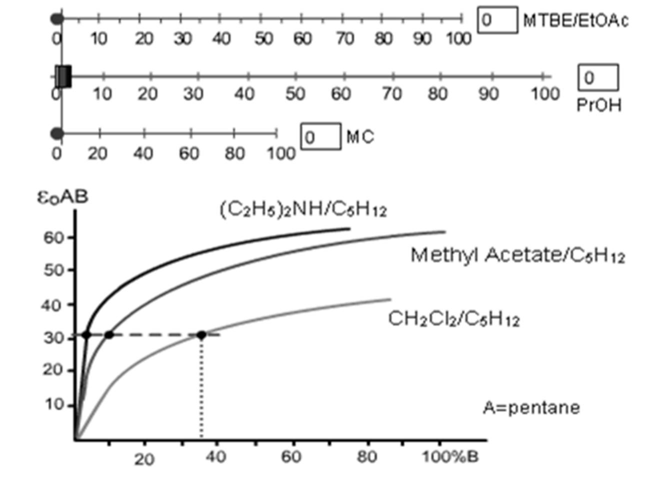
4-1- Chromatographie à polarité de phase normale (NP)

Définition: la chromatographie en phase normale utilise une phase stationnaire plus polaire que la phase mobile
Phase stationnaire: silice greffée ……………………….
Phase mobile: ………………………………………….



ordre d'élution : Les analytes polaires sont retenus plus longtemps dans la colonne que les composés moins polaires

Optimisation de la phase mobile
Différents solvants peuvent modifier la sélectivité
Utilisation de nomographe



Exemple
–Élution par 92% n-pentane – 8% methylacétate
•Faible sélectivité
•Durée correcte
–Remplacement par
62% n-pentane 38% methylènechloride

4-2- Chromatographie à polarité de phase inversée (RP)

Définition : la chromatographie en phase inverse utilise une phase stationnaire moins polaire que la phase mobile
Phase stationnaire :hydrophobe, liée chimiquement à un support de silice:
Phase mobile:

la polarité du solvant augmente dans le sens de la flèche

PHASE INVERSÉE

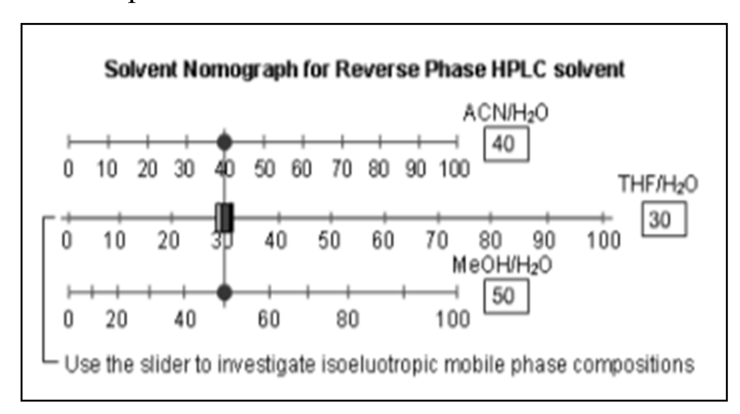
adsorbant peu polaire

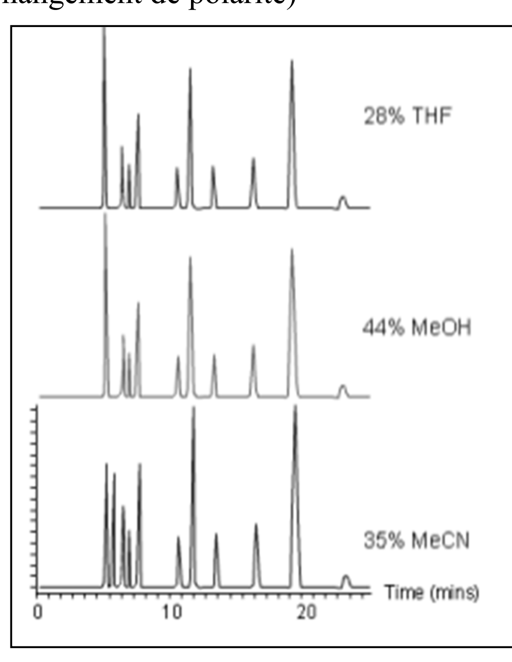
la polarité de l'échantillon augmente

solvant polaire
solvant très polaire
B
A
A B A B

Optimisation de la phase mobile :
- choix du modificateur :
L'eau est le solvant le plus faible car il est le plus polaire
Le modificateur est moins polaire que l'eau
Plus on ajoute de modificateur plus les temps de rétention sont courts
Changer le modificateur change la sélectivité et la rétention (changement de polarité)

utilisation d'un nomographe
Permet de sélectionner un autre solvant
-pour une durée d'élution à peu près identique
(………………………….)
- pour une sélectivité différente





Rétention en chromatographie de phase inverse

Le caractère hydrophobe est le premier indicateur d'une rétention
- –le caractère hydrophobe s'exprime par log P (partition entre eau – octanol)
- –plus log P est grand plus le composé est hydrophobe

L'ordre d'élution est gouverné par la solubilité et le nombre d'atome de carbone
- –moins le composé est soluble, plus la rétention est grande
- –la rétention augmente avec le nombre d'atomes de carbone
- –les composés ramifiés sont élués plus rapidement que leurs isomères linéaires
- –les insaturations diminuent la rétention

L'ordre général d'élution est:

5- Les modes de travail

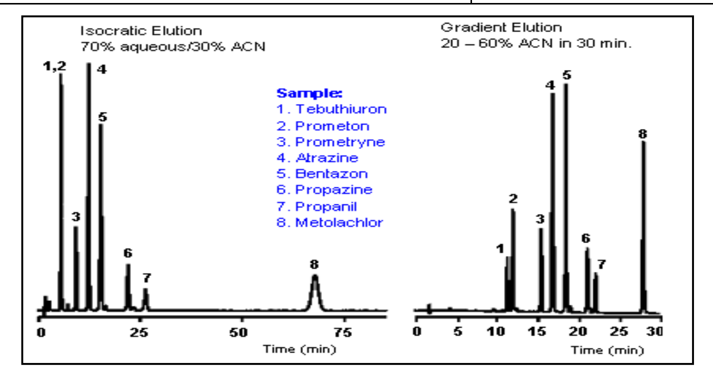
Mode isocratique

- la composition de la phase mobile reste inchangée
- certains problèmes peuvent survenir
    - une grande diversité de polarité des analytes
    - temps d'élution long
    - mauvaise sensibilité pour les composés très retenus car les pics sont larges
    - possibilité de rétention irréversible conduisant à des contaminations

Mode à gradient d'élution

–la composition de la phase mobile change au cours de l'analyse
–la composition initiale est choisie pour séparer les composés les plus rapidement élués
–la force d'élution est augmentée pour éluer les composés avec une sélectivité optimum
–la composition finale est choisie pour éluer l'ensemble des composés dignes d'intérêt
–il est possible d'augment la force éluante pour éliminer les composés très retenus pouvant conduire à des contaminations

	Gradient d'élution	Exemple
Phase normale (LC-NP)		
Phase inverse (LC-RP)		



6- Optimisation

L'efficacité a une grande influence sur la résolution
Les paramètres ayant une influence sur l'efficacité sont

- Longueur de la colonne (doubler la longueur double N)
-
-
-

$$R_S = \boxed{1/4\sqrt{N}} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1+k}$$

Efficiency — Selectivity — Retention

La sélectivité a une grande influence sur la résolution
Les paramètres ayant une influence sur la sélectivité sont

-
-
-

$$R_S = 1/4\sqrt{N} \times \boxed{\frac{\alpha - 1}{\alpha}} \times \frac{k}{1+k}$$

Efficiency — Selectivity — Retention

Le meilleur moyen de modifier **la rétention** est
de changer la force du solvant

– une augmentation de 10% du modificateur diminue k d'un facteur 2 ou 3
– gain maximal de résolution pour k compris entre 1 et 5

$$R_S = 1/4\sqrt{N} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \boxed{\frac{k}{1+k}}$$

Efficiency — Selectivity — Retention

<u>Exercice d'application</u> :
Les facteurs de rétentions de 2 solutés sur une colonne C18 (L = 15 cm ; d_C = 4,6 mm; porosité = 70%) sont respectivement 0,96 et 1,07 ; La phase mobile est un mélange H_2O/MeOH 40/60 ; Le temps mort est t_m = 2,3 min
On décide de doubler la longueur de colonne en conservant le même débit ;
A) Déterminer :

- Le volume mort de la colonne
- Les temps de rétention et le temps mort du système
- Les facteurs de rétention

B) Comment vont évoluer les paramètres suivant :

- La sélectivité
- L'efficacité
- La résolution

7- La chromatographie de surface

–Sur papier

–**Sur couche mince** (plaque d'aluminium ou de verre sur laquelle est déposée la phase stationnaire)

Phénomènes exploités :

– **adsorption**

– partage

– échange d'ions

phase stationnaire : Silice, alumine, cellulose

- plus un composé est polaire plus il sera fortement adsorbé

phase mobile : Solvants plus ou moins polaires purs ou en mélange

- plus l'éluant est polaire plus les composés se déplacent rapidement

CCM (Chromatographie sur Couche Mince)

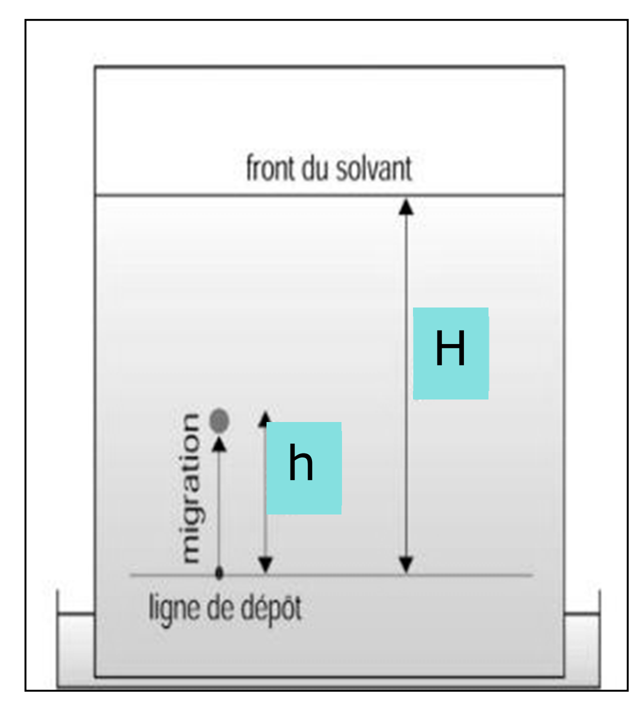
Principe: adsorption

– **phase stationnaire**

solide, fixée sur un support adsorbant inerte.

– **phase mobile**

non miscible avec la phase stationnaire,
migre par capillarité.



Rapport frontal R_f

Résolution R

Efficacité N

IV- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Domaine d'application

–Molécules volatiles (pression de vapeur notable en dessous de 250°C)

–Dérivatisation pour augmenter la volatilité

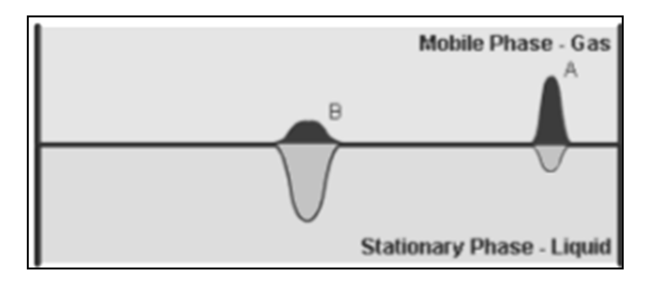
–Masse moléculaire < 500 $g.mol^{-1}$

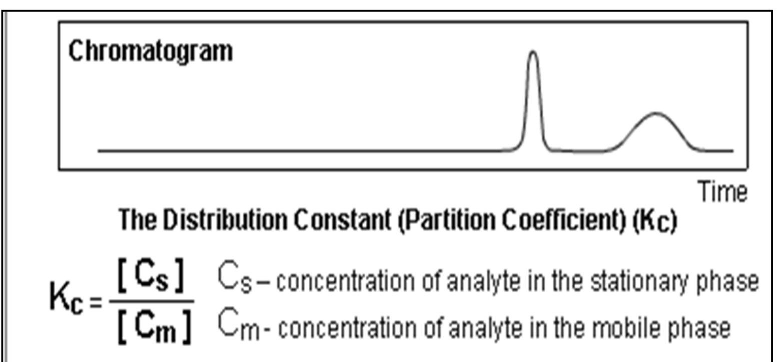
–Les molécules fortement polaires sont moins volatiles quand elles sont dans des solvants polaires (forces intermoléculaires)

Mécanismes

–Adsorption (phase stationnaire solide)

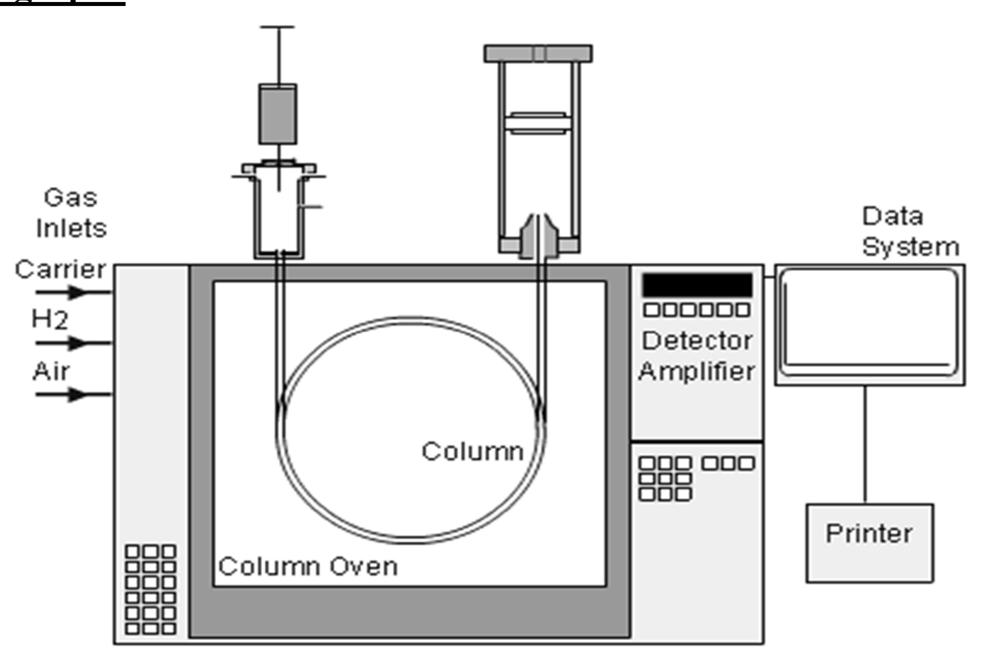
–Partage (phase stationnaire polymérique





1- L'appareillage et les accessoires

Le chromatographe



2- Le gaz vecteur

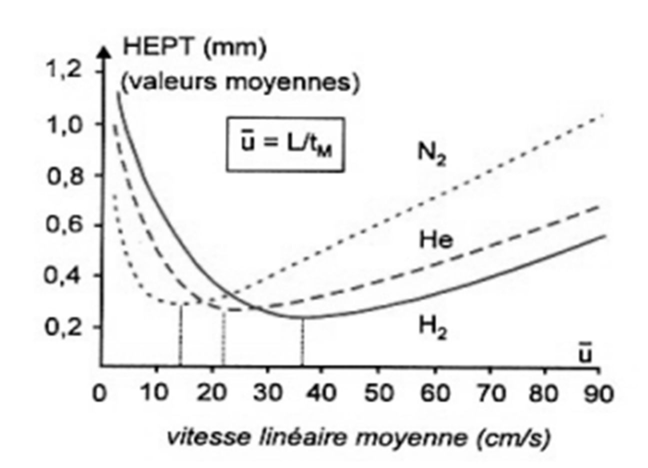
Inerte chimiquement

Choix selon détecteur

H_2 ou He pour les catharomètres

N_2, H_2 ou He pour les FID

N_2 ou Ar/CH_4 pour les ECD



3- Les seringues chromatographiques

Le volume injecté ne doit pas être inférieur à 10% du volume total de la seringue

Seringue à aiguille fixe:

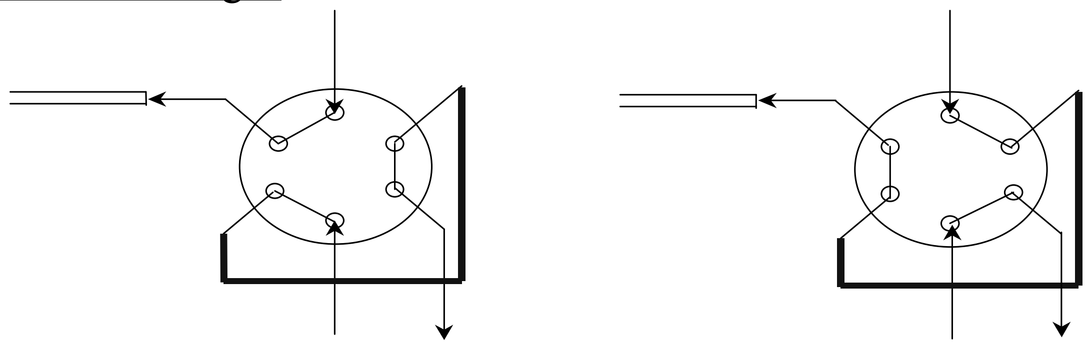
- pour les chromatographistes expérimentés
- ont les volume morts les plus faibles

—**Seringue à aiguille amovible**

- Pour les chromatographistes moins expérimentés

4- Les injecteurs

4-1- Les vannes à gaz



4-2- Les injecteurs à vaporisation

Vaporisation directe

–L'échantillon introduit est immédiatement vaporisé et part dans la colonne
–Convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires

Injecteurs split/splitless

Mode de fonctionnement split

-Une fraction de l'échantillon pénètre dans la colonne
-Pour fortes concentrations
-Volatilisation rapide : pics étroits
-Phénomène de ségrégation

Mode de fonctionnement splitless

-Injection lente
-La vanne 2 est fermée (0,5 à 1 min.)
-Concentration des soluté en tête de colonne
-Ouverture de la vanne 2 pour éliminer le restant de l'échantillon
-Pour les faibles concentrations
-Très répétable
-Plus complexe (optimisation du temps de splitless)
-Problème avec les produits thermodégradables
- Cryofocusing

Injecteur à température programmable PTV

–Température de l'injecteur peut être programmée de 20 à 400°C en quelques dizaines de secondes

4-3- Les injecteurs on-column

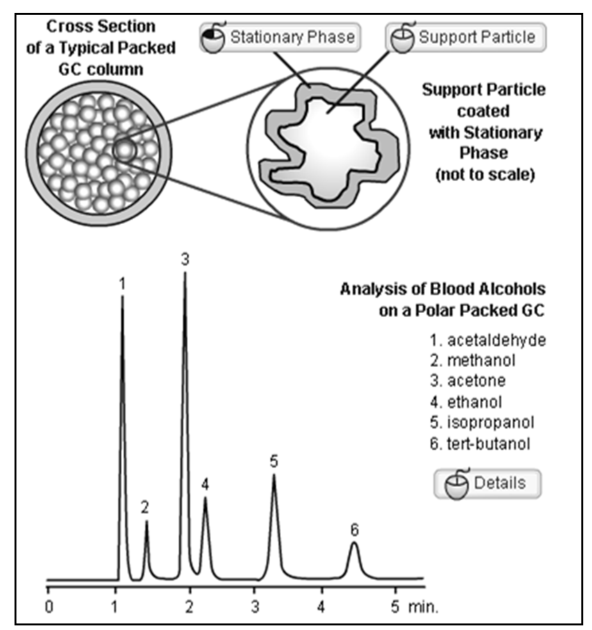
–L'aiguille de la seringue pénètre dans la colonne

4-5- Les différents modes d'injection

- Aiguille froide
- Aiguille chaude
- Air gap technique
- Solvent flush

5- Les colonnes (régulées en température)

5-1- Les colonnes remplies



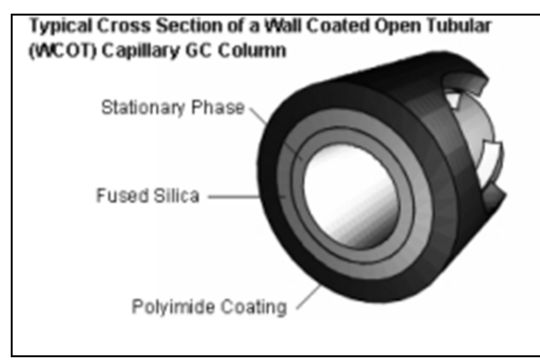
Matériaux
- Acier inoxydable
- Aluminium
- Cuivre
- Verre
- Teflon

Dimensions
- Longueur : 2 à 3 mètres
- Diamètre : 1/8’’ ou 1/4’’

Remplissage
- Adsorbant
- Support inactif imprégné d ’une phase



5-2- Les colonnes capillaires



WCOT *(Wall Coated Open Tubular)*
COT *(Coated Open Tubular)*
Golay

SCOT *(Support Coated Open Tubular) (support imprégné)*
PLOT *(Porous Layer Open Tubular) (à couche poreuse)*

Capillaires remplies
Micropacked

Caractéristiques et Domaine de températures

①　②　③

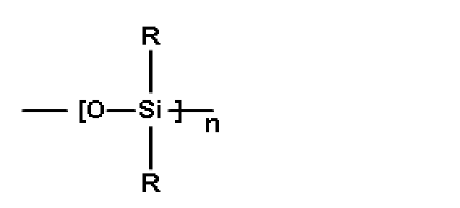
BP1　**30m x 0.25mm x 0.25mm, -60/325 (350)°C**

Les phases stationnaires solides: pour le gaz permanents et les composés très volatils
- Tamis moléculaire
- Alumine
- Charbon actif
- Noir de carbone graphitisé
- Polymères poreux
- Copolymères du styrène et du divinylbenzène

Les phases stationnaires liquides

Les hydrocarbures ramifiés
- Squalane (hexaméthyl tétradécane)　$60 < T°_{travail} < 120°C$
- Apiezon　$50 < T°_{travail} < 200°C$
- Apolane　$20 < T°_{travail} < 220°C$

Les polysiloxanes -20 < T°travail< 400°C

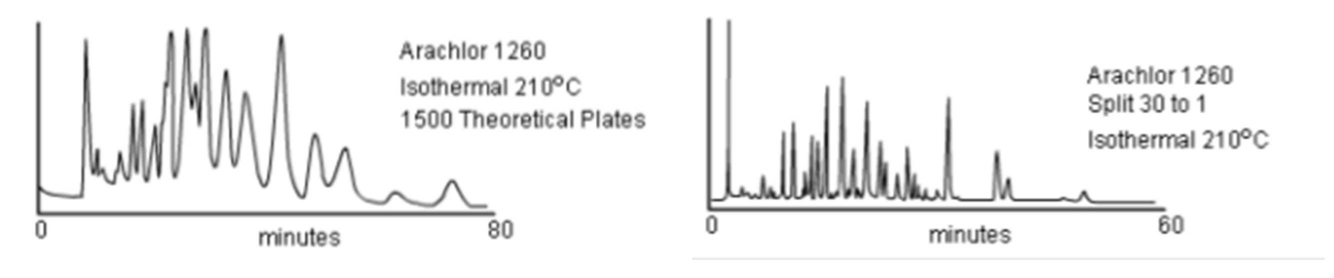


R = CH_3 methyl
$CH_2CH_2CH_2CN$ cyanopropyl
$CH_2CH_2CF_3$ trifluoropropyl
phenyl

Les polyéthers

Carbowax OH-$(CH_2$-CH_2-O$)_n$-H

5-3- Différence colonne remplies – colonnes capillaires



5-4- Choix de la phase stationnaire

Les composés dissolvent leurs semblables :les analytes non polaires réagissent avec une phase non polaire

Composés non polaires (alcanes) : sur colonne non polaire (100% dimethyl polysiloxanes)

Composés polaires : sur colonne polaire (carbowax)

Phase stationnaire	Nom commercial	Température maximale/°C	Utilisations habituelles
Polydiméthyl siloxane	OV-1, SE-30	350	Phase non polaire à usage général ; hydrocarbures ; aromatiques polynucléaires ; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5% Phényl-poly-diméthyl siloxane	OV-3, SE-52	350	Esters méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés
50% Phényl-poly-diméthyl siloxane	OV-17	250	Médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols
50% Trifluoropropyl-polydiméthyl siloxane	OV-210	200	Chloroaromatiques ; nitroaromatiques ; alkylbenzènes substitués
Polyéthylène glycol	Carbowax 20M	250	Acides libres ; alcools ; éthers ; huiles essentielles ; glycols
50% Cyanopropyl-polydiméthyl siloxane	OV-275	240	Acides gras polyinsaturés ; acides de la colophane ; acides libres ; alcools

5-4-1- Interactions dispersives

Tous les types de phase donnent des interactions dispersives

Les méthyl et phenyl polysiloxanes donnent les interactions les plus fortes

Les composés les plus volatils sont les premiers élués

Si les analytes comportent des fonctions chimiques différentes, l'analogie avec le points d'ébullition n'est plus vrai

Si les composés ont des points d'ébullition différant de plus de 30°C ils peuvent être séparés par toutes les phases

Si les composés ont des points d'ébullition différant de moins de 10°C l'analogie des points d'ébullition est une erreur

5-4-2- Interactions dispersives et polarité

Importance du taux de groupements phényl dans une phase stationnaire

Plus le taux est important plus la phase est polaire (présence d'électrons Π)

Plus la teneur est importante plus la rétention des composés aromatiques est importante par rapport aux alcanes

5-4-3- Interactions dipolaires et liaisons hydrogène

- Si la phase donne des interactions dipolaires, elle permet de séparer les composés dont les moments dipolaires sont différents : Cyanopropyl, trifluoropropyl et polyethylène glycol (PEG)
- Si la différence de moment dipolaire des analytes est faible, une grande quantité de groupement approprié dans la phase stationnaire est nécessaire
- Les phases PEG donnent les interactions liaisons hydrogènes les plus fortes

5-4- Longueur de colonne

L'efficacité de la colonne est proportionnelle à la longueur

–Doubler la longueur de la colonne double l'efficacité

La résolution est proportionnelle à la racine carrée de N

–Doubler la longueur de la colonne augmente de 41% l'efficacité

Doubler la longueur de la colonne

–double le temps d'analyse en isotherme

–Multiplie entre 1,5 et 1,7 fois le temps d'analyse en mode programmation

5-5- Diamètre interne de la colonne

L'efficacité est inversement proportionnelle au diamètre de la colonne

–Diminuer par 2 le diamètre de la colonne

-double l'efficacité

-Augmente la résolution d'un facteur 1,4

Le temps de rétention est inversement proportionnel au diamètre en isotherme

5-6- Épaisseur de phase

L'épaisseur du film modifie

–**La rétention (** temps de rétention proportionnel à l'épaisseur du film en isotherme ;en programmation de température le rapport est de 1,5/1)

–**La capacité (**La capacité est supérieure pour des colonnes à film épais)

–**La résolution**

-Les composés dont $k < 2$ sont mieux résolus lorsque l'on augmente l'épaisseur

-La résolution augmente pour les composés dont $2 < k < 10$

-Pour les composés dont $k > 10$ l'amélioration n'est pas notable

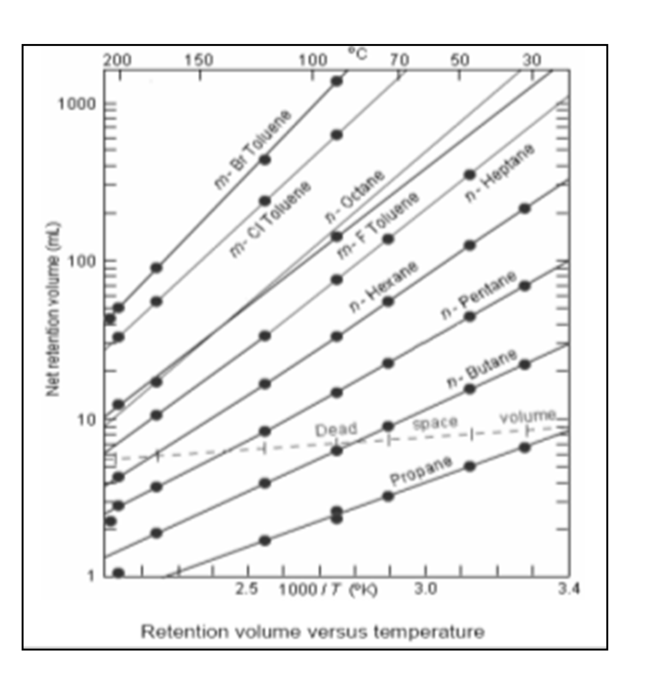
–**Le bleeding** (le bleeding est plus important aux températures limites)

5-7- Rapport de phase β

Définition :

Augmenter le rapport de phase diminue la rétention
Intérêt du rapport de phase
- Garder la même rétention
- Changer l'allure du chromatogramme

6- Rôle de la température



Retention volume versus temperature

La température est un paramètre important.
Elle joue un rôle sur la rétention, la sélectivité, l'efficacité

Les courbes montrent que:
–La rétention augmente quand la température diminue
–Les droites ne sont pas parallèles : la sélectivité diminue avec la température
–La séparation est meilleure à basse température
–L'intersection des courbes indique une co-élution à cette température

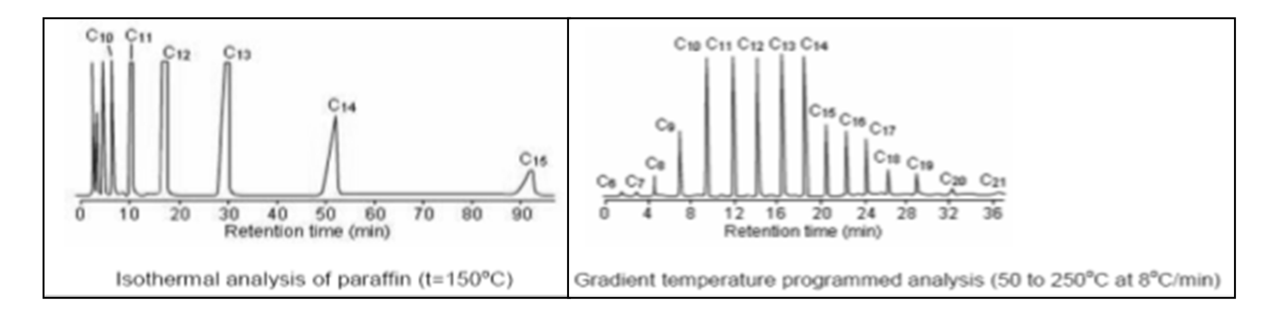
6-1- Isotherme et gradient de température

Mode isotherme

–Pour les composés de même volatilité
–Rétention similaire
–Pour les composés dont la rétention diffère
  Mauvaise forme de pics
  Mauvaise sensibilité pour les composés fortement retenus
  Mauvaise séparation pour les composés dont k < 2
–Pour les composés d'une série homologue la rétention varie de manière logarithmique

Mode programmation

–Température initiale faible pour la séparation des composés à bas point d'ébullition
–Augmentation de la température pour permettre l'élution des « autres » composés
–Pour une série homologue la rétention est linéaire avec la température
–Les composés sont élués avec à peu près la même largeur de pic
–La sensibilité augmente pour les composés élués le plus tardivement



Isothermal analysis of paraffin (t=150°C) | Gradient temperature programmed analysis (50 to 250°C at 8°C/min)

6-2- Théorie de la programmation de température

- En gradient de température la rétention est diminuée par 2 tous les 30°C
–Les analytes sont initialement immobilisés en tête de colonne
–Ils stagnent jusqu'à ce que T devienne compatible avec leur vaporisation et le partage dans la colonne
–Comme chaque analyte à une pression de vapeur propre, c'est le principal processus de séparation en gradient de température
–Une fois que le composé commence à être chromatographié, il accélère dans la colonne à la même vitesse que les autres analytes

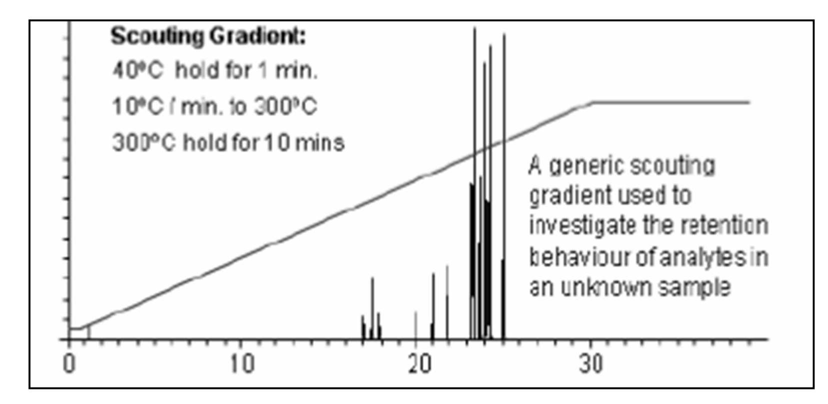
Utilisation et mise en place de la programmation

Une programmation classique est utilisée pour évaluer la nature de l'échantillon (gamme de volatilité, nombre de composés, adaptation de la phase, etc.) en général on adopte la programmation suivante:

La température initiale doit être aussi basse que possible
Le gradient doit être de 10°C/min
La température finale doit être compatible avec la température limite de la colonne
Le temps final doit être de 10 min pour permettre l'élution des composés
Si les pics éluent dans un temps inférieur à 25% du temps du gradient, il est possible de travailler en isotherme (se placer à $T = T_f + 45$)

6-3- Optimisation de la programmation

-Température initiale et durée
-Rampe
-Température finale et durée



6-4- Avantages et inconvénients d'une programmation

Avantages

–Utile pour découvrir la nature de l'échantillon
–Meilleure séparation pour des composés qui ont des rétentions différentes
–Amélioration de la limite de détection, la forme des pics et la précision
–Permet le nettoyage de la colonne
–Est nécessaire pour certains types d'injection : splitless

Inconvénients

- Plus complexe
- Augmentation du bruit de fond
- Dégradation plus rapide de la colonne
- Analyse plus longues du fait du refroidissement de la température

Besoins instrumentaux

-Gaz secs
-Possibilité de maîtriser la température du four
-Utiliser une régulation de pression pour maintenir le débit constant
-La phase de la colonne doit supporter les températures utilisées

Exercice d'application :

L'évolution du facteur de rétention du n-décane et du n-tridécane en fonction de la température dans une colonne GC à débit de gaz vecteur constant est :

n-décane : $\log k_1 = -6,58 + \frac{2450}{T}$; n-tridécane : $\log k_2 = -7,91 + \frac{3010}{T}$ (T en K)

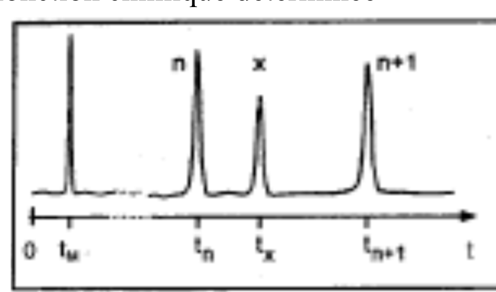
A) à quelle température ces 2 solutés coéluraient ils ?
B) à 100 °C , déterminer le facteur de sélectivité
C) en déduire les coefficients de distribution K_1 et K_2 sachant que le rapport de phase de la colonne est $\beta = 250$

7- Caractéristiques des phases stationnaires :

7-1- Les indices de Kovats

Le temps de rétention varie avec la longueur de chaîne d'une fonction chimique déterminée

Droite de Kovats



Détermination de Ix

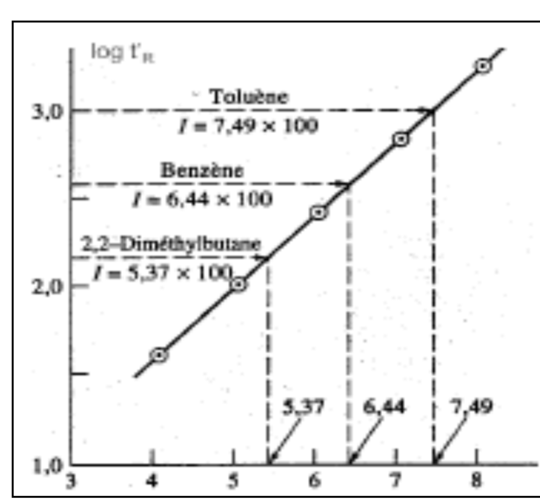
On co-injecte un composé X avec une série homologue de n-alcanes

- L' indice du composé X est égal à **Ix = 100 x** où x correspond au nombre de C de « l'alcane théorique » ayant le même t'_R

-Ix ne dépend que de la nature de la phase stationnaire

Méthode graphique

On reporte logt' $_R$(X) sur la droite de Kovats



Par le calcul

On utilise les t'_R des 2 alcanes qui encadrent X sur le chromatogramme

- n = nombre d'atomes de carbone de l'alcane linéaire précédant la sortie du composé X
- t'_R(X =temps de rétention réduit du composé X
- $t_R'(n)$=temps de rétention réduit de l'alcane linéaire à n atomes de C précédant la sortie du composé X
- $t_R'(n+1)$=temps de rétention réduit de l'alcane linéaire à (n+1) atomes de C suivant la sortie du composé X

7-2- Tables des indices des composés sur différentes phases

L'indice de rétention sur une phase et dans des conditions données constitue une information sur l'identification des molécules

Cette méthode est exploitable si l'on dispose pour les composés étudiés de tables d'indices de rétention sur les phases courantes (squalane,SE 30,Carbowax…)

Exercice d'application :

Au cours d'une séparation d'un mélange d'hydrocarbures, les temps de rétention réduits mesurés sont :

Propane : 2,23 min ; isobutane : 5,71 min ; butane : 6,67 min

Calculer l'indice de Kovats de chaque composé

7-3- Constantes de McReynolds des phases stationnaires

Constante calculée par comparaison des indices de Kovats de 5 composés témoins appartenant à des familles chimiques différentes sur la phase étudiée d'une part , et d'autre part sur le squalane ($C_{30}H_{62}$) utilisée comme référence (seule phase reproductible car produit pur)

Les 5 constantes sont calculées, pour une phase donnée:

Cte de McReynolds =

La somme des ces 5 valeurs est retenue pour définir la polarité globale de la phase testée

Phase station.	Benzène	1-butanol	2-pentanone	Nitropropane	Pyridine
Squalane	0	0	0	0	0
SPB-octyl	3	14	11	12	11
SE-30 (OV-1)	16	55	44	65	42
Carbowax 20M	322	536	368	468	310

Ces constantes permettent d'apprécier les forces d'interaction soluté/phase stationnaire en relation avec quelques grandes classe de composés.
Un produit dont l'indice est élevé indique que la phase étudiée retient fortement les composés qui seront porteur de la fonction chimique considérée
Ainsi pour séparer un aromatique d'un mélange de cétones, on choisira une colonne pour laquelle la constante du benzène est assez différente de celle de la 2-pentanone

<u>Exercice d'application</u> :
Le temps de rétention réduit du butan-1-ol sur une colonne de type DB-1 est 168 s
L'équation de la droite de Kovats pour cette colonne déterminée à partir du chromatogramme d'un mélange de n-alcanes est $\log t'_R = 0,39\,n - 0,29$ (t'_R exprimé en secondes)
Déterminer la constante de McReynolds du 1-butanol sur cette colonne sachant que son indice de Kovats sur colonne squalanne est de 590

8- Les détecteurs

Détecteurs universels : détection des composés toutes familles chimiques confondues
Détecteurs spécifiques :détection de composés spécifiques
Détecteurs structuraux : identification des composés

Détecteur	**Spéc**	**Sens**	**Gd**
Emission atomique (AED)	non		
Chimiluminescence	S,O, N, P	---	---
Détecteur par capture d'électron (ECD)	halogènes		10^4
	Carbonyles		10^4
	Nitrates		10^4
Détecteur à ionisation de flamme (FID)	non		10^8
Détecteur thermo-ionique (NPD)	P, N		10^5
Photométrie de flamme (FPD)	P		10^4
	S	10-100pg	---
Spectromètre de masse (MS)	non		10^6
Détecteur à photo-ionisation (PID)	n, π conjugués		10^6
Catharomètre (TCD)	non		10^6

8-1- Caractéristiques générales

Réponse du détecteur : dépend
- de la concentration du soluté dans le gaz vecteur, en sortie de colonne, exprimée par ex en mg/ml.
- du débit massique (masse de soluté par unité de temps)

Sélectivité : réponse universelle ou sélective
Sensibilité : augmentée par amplification électronique du signal, mais un " bruit de fond " apparait
la quantité minimale détectable (Q.M.D.) est la quantité de soluté égal à 2 fois le bruit de fond
Linéarité :
la "gamme linéaire" définit le domaine où la réponse du détecteur en fonction de la concentration du soluté est linéraire**.**

8-2- Le catharomètre

Détecteur universel
Principe : Mesure de la conductibilité thermique des composés chimiques
Performances –Sensibilité : µg
–Linéarité : 10^5
–Facile d'utilisation

8-3- Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Détecteur universel le plus utilisé en CPG : (réponse à presque tous les composés organiques)
Principe : Mesure du courant ionique dans la flamme
Performances –Sensibilité : 10 pg
–Linéarité : 10^7
–Facilité d'utilisation
–stabilité

V – La chromatographie d'exclusion stérique :

Domaine d'application

–Macromolécules naturelles et synthétiques : polypeptides, protéines, sucres, polymères

Mécanismes

–Méthode fondée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans les pores de la phase stationnaire

–La séparation des molécules s'effectue donc en fonction de leur taille et de leur forme

–Les molécules sont entraînées par la phase mobile à travers la phase stationnaire constituée de grains poreux

–La phase stationnaire est aussi appelé GEL

1- Principe de séparation

- Les petites et les grosses molécules sont donc éluées différemment
- Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement puisque incluses dans le gel.
- Les grosses molécules (diamètre supérieur à celui des pores) exclues sont donc éluées les premières.

2- Temps de séjour dans la colonne

Le temps de séjour d'une molécule X dans la colonne dépend de son coefficient de diffusion à travers les pores:

$[X]_{sta}$ = C dans la phase intra-granulaire

$[X]_{mob}$ = C dans le liquide extra-granulaire

- si Kd = 0,
  → Molécules totalement exclues de la phase stationnaire.
  → Migration rapide.
  → Elles sortent en premier.
- si 0 < Kd < 1
  → les molécules sont séparées par la phase stationnaire.
  → plus elles sont petites, plus Kd est élevé donc leur temps de séjour est important.
- si Kd = 1
  → les molécules diffusent parfaitement dans la phase et sortent en dernier. - si Kd > 1
  → un autre phénomène se rajoute à l'exclusion stérique : phénomène de partition (interaction entre soluté et phase stationnaire)

3- Volume d'élution :

- Les molécules éluées dans l'ordre inverse de leurs tailles (donc de leurs masses moléculaires)
- volume d'élution = Ve (ou volume de rétention Vr)
  = D (débit) x t (temps)

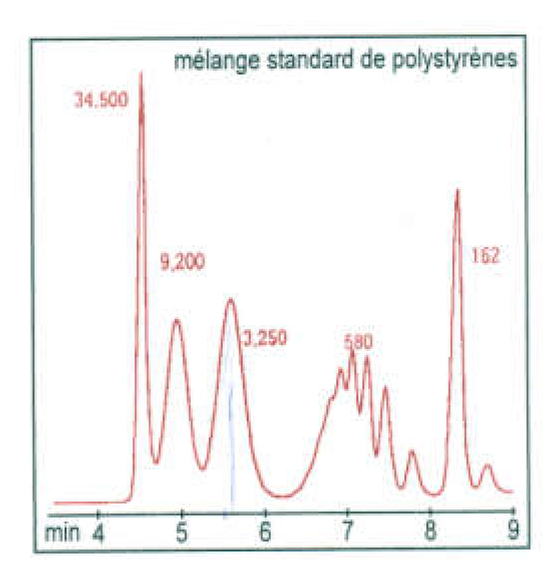
$V_e = V_i + K_D . V_p$ soit

Vi (ou V_0) = volume interstitiel
mesuré avec une grosse molécule (non retenue)

Vp = volume des pores

Vm = volume mort
= volume de phase mobile dans la colonne = Vp + Vi
mesuré avec une petite molécule (fortement retenue)

Exercice d'application :
On chromatographie une solution dans le THF d'un mélange de polystyrènes de masses moléculaires connues sur une colonne (I.D=7.5mm, L=300mm) dont le domaine de perméation s'étend de 400 à 30 000 daltons. La phase éluante est du THF. Son débit est 1mL/min
A) Déterminer le volume interstitiel et le volume des pores de la colonne
B) Calculer le coefficient de diffusion Kd du comosé de masse 3250 Da



4- Les phases :

4-1-Les phases stationnaires :

Gel = solide poreux et liquide qu'il contient
- Petites billes sphériques (Ø de 40 à 300 µm)
- Porosité très homogène (Ø des pores de 4 à 50 nm) définie par le procédé de fabrication
- Polymères réticulés de nature organique ou minérale.
- Plus le gel est réticulé, plus les pores seront petits

4-1-1- Les gels hydrophiles : filtration de gel

- gel de dextrane (Séphadex) : polyhoside polymérisé
-gel de polyacrylamide (Biogel)
Utilisation : séparation de molécules solubles (polysaccharide,protéines…) dans les éluants polaires

4-1-2- Les gels hydrophobes : perméation de gel

- gel de polystyrène – divinylbenzène (Styragel)

Utilisation : séparation de molécules peu polaires ou apolaires (lipides, polymères synthètiques …)
La phase mobile utilisée est apolaire

4-1-3-Domaine de perméation des gels :

Une phase stationnaire présente une masse inférieure et une masse supérieure

→ pas de séparation possible en dessous et au dessus de ces masses

pour $M< M_{inf}$, les molécules ont le même coefficient de diffusion $K_D = 1$.

pour $M>M_{sup}$, les molécules ont un $K_D = 0$.

→ pas de séparation dans les deux cas

4-2-Les phases mobiles

Molécules, φ stationnaire et φ mobile doivent avoir des polarités voisines pour espérer une séparation.

- Filtration sur gel : éluant à base d'eau
- Perméation sur gel : éluant de nature organique

4-3- Détecteurs :

-Détecteur viscosimétrique
-Détecteur réfractométrique differentiel à déviation

5- Applications

5-1- Détermination de la distribution en masse d'un polymère

Etape 1 : établissement d'une droite étalon.

- On réalise pour cela une chromatographie de macromolécules de masses connues et de structures analogues à celles analysées.
- On trace ensuite log(Mstandards) = f (Ve standards)

Etape 2 : chromatographie de l'échantillon de composition inconnue.

→ Nombre de composés et leur Ve

- On reporte les Ve sur la droite étalon, ce qui permet d'obtenir la masse moléculaire de chacune des différentes fractions

5-2- Analyse d'échantillons

5-3- Filtration sur gel

Purification de protéines après leur extraction : un gel très réticulé va retenir les petites molécules utilisées lors de l'extraction